

# PROPAGACIÓN CLONAL *IN VITRO* DE *Eucalyptus pellita*, F. MUELL.

A. L. Noda-Jiménez; P. A. Álvarez-Olivera; L. Junco-Cruz; M. García-López;  
R. Sotolongo-Sospedra

Centro de Estudio de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río. Carretera a San Juan y Martínez Km 5. C.P. 20300,  
Pinar del Río, Cuba E-Mail alnoda@af.upr.edu.cu

## RESUMEN

La propagación de individuos superiores de las poblaciones de *Eucalyptus pellita* es una alternativa de mejoramiento promisorio, por lo que es objetivo de este trabajo, establecer la tecnología para la propagación clonal *in vitro* de genotipos seleccionados, con el fin de obtener plantas de alta calidad, destinadas a las plantaciones o a huertos clonales.

De los tocones con brotes jóvenes, de los árboles seleccionados, se tomaron microesquejes que fueron seccionados en segmentos nodales y desinfectados. Se logró que el 38.3 % de los mismos se establecieran en condiciones asépticas; éstos se transfirieron a medios de cultivo para su multiplicación, suplididos con citocininas y auxina.

Por cada yema cultivada *in vitro*, se obtuvo como promedio, en los medios de multiplicación, 25.4 tallos cada 30 días, durante los tres primeros subcultivos. A medida que aumentó el número de subcultivos, aumentó también la tasa de multiplicación, formándose grandes macollos de multiyemas.

Para inducir el enraizamiento, se utilizaron medios de cultivo líquidos, suplementados con AIB (Ácido indolbutírico) y AIA (Ácido Indolacético). La mezcla de estas hormonas con 0.2 mg·L<sup>-1</sup> cada una, proporcionaron un 85 % de enraizamiento y una buena conexión de los sistemas vasculares entre raíz y tallo. En la etapa de adaptación al vivero, con condiciones controladas de umbráculo, se logró una sobrevivencia del 80 % a los 20 días.

**PALABRAS CLAVE:** Biotecnología, micropropagación, *Eucalyptus*, *Eucalyptus pellita* F. Muell.

## *In vitro* CLONAL PROPAGATION OF *Eucalyptus pellita* F. MUELL

## SUMMARY

Propagation of superior genotypes of *Eucalyptus pellita* is a promising alternative for afforestation and breeding programs. This paper describes the technology for the clonal propagation of selected trees of *E. pellita* to obtain seedlings of high quality for planting directly in the field or for establishing seed orchards.

Young shoots from selected trees were cut as uninodal stumps and disinfected in a sodium hypochloride solution. Survival of aseptically established node segments was 38.3 %. The segments were transferred to culture media containing auxins and cytokinins. Eight treatments were designed to study the effect of the hormones and their interaction.

An average of 25.4 small stems per cultured bud was obtained every 30 days during the first three subcultures. The multiplication rate increased with the number of subcultures, and large masses of buds were observed. For root induction, the liquid media tested were supplemented with IBA and IAA. The treatment in which both auxins were combined at 2 mg·L<sup>-1</sup> provided 85 % rooted explants with a good connection between the vascular system of the stem and the root. The acclimatization step developed under controlled conditions in a nursery with 80 % survival at 20 days.

**KEY WORDS:** Biotechnology, Micropropagation *Eucalyptus*, *Eucalyptus pellita* F. Muell.

## INTRODUCCIÓN

Cuba es un país que en las últimas cuatro décadas ha aumentado su superficie forestal de un 13.4 % en 1959 a un 21.6 en 1998, por lo que presenta un balance positivo de tala/plantación. Sus bosques nativos han sido muy explotados, por tanto, actualmente la producción maderera está sustentada en más de 450,000 ha de plantaciones de pinos autóctonos y eucaliptos introducidos, según Báez y Diago (1998).

En los últimos quince años, se han introducido y probado más de 60 especies de eucaliptos, algunos de los cuales se han adaptado muy bien a determinadas localidades y constituyen, conjuntamente con introducciones anteriores, un potencial productivo de gran significación, siendo la demanda de sus diferentes surtidos madereros, superiores aún a la oferta.

*Eucalyptus pellita* F. Muell constituye, para el occidente de Cuba, un potencial productivo de gran significación, por su adaptación a los suelos sílico-arenosos ácidos de la región. En 1986, el Instituto de Investigaciones Forestales, inició un programa de mejoramiento genético en el género, en las poblaciones de *Eucalyptus pellita* F. Muell y *Eucalyptus saligna* Sm, con el fin de identificar y propagar genotipos bien adaptados de la calidad deseada, para su plantación masiva.

El desarrollo de procedimientos eficientes para la micropropagación, vía organogénesis, de ejemplares superiores de *Eucalyptus*, cuyas especies son ampliamente utilizadas en los planes de reforestación, principalmente en la provincia de Pinar del Río, permitirán el escalado de las técnicas *in vitro*, con ventajas tecnológicas y económicas sobre los sistemas convencionales de la macropropagación.

Estas técnicas biotecnológicas han sido utilizadas en muchas partes del mundo para la micropropagación de árboles selectos, (Gupta y Mascarenhas, 1983), (Ikemori, 1987), (Durand *et al*, 1991), (Major y Krause, 1995), (Aloísio, 1997), (Castro, 1998). Sin embargo, de esta especie, *Eucalyptus pellita* F Muell, no se conocen referencias sobre investigaciones realizadas en este campo.

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar la tecnología para la propagación clonal *in vitro* de árboles elite de *Eucalyptus pellita* por la vía organogénica, teniendo en consideración que la inducción de brotes axilares a partir de segmentos nodales tomados de tocones de árboles seleccionados, pudiera permitir la propagación clonal *in vitro* de la especie, proporcionando un incremento considerable de la tasa de multiplicación potencial.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, de la Universidad de Pinar

del Río, Cuba. Se tomaron segmentos nodales de rebrotes de tocones de árboles plus, los que se desinfectaron de la siguiente forma: tratamiento con hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 20 minutos en agitación, varios enjuagues con agua destilada. A continuación la inmersión en una solución de sacarosa al 5 %, durante una hora en agitación y tratamiento nuevamente con NaClO, esta vez al 1 %, durante 10 minutos en agitación.

El medio de cultivo se constituyó con las sales minerales propuestas por Murashige y Skoog (MS), (1962): sacarosa (20g·L<sup>-1</sup>) y 6-BAP(6-Bencilaminopurina) (0.5mg·L<sup>-1</sup>), con pH 5,7. Para controlar la oxidación fenólica se aplicaron enjuagues a los explantes en solución antioxidante y se adicionaron antioxidantes al medio de cultivo (L-cisteína + carbón activado (CA) (25 mg·L<sup>-1</sup> y Ig·L<sup>-1</sup>, respectivamente)

Para inducir la proliferación de yemas axilares se empleó el medio de cultivo MS, las vitaminas formuladas por Gamborg and Shyluk (1981), sacarosa al 3 %, agar tipo E (4g·L<sup>-1</sup>) y se establecieron 8 tratamientos para analizar el efecto de las hormonas: Cinetina, BAP y AIB, en pH 5,7. (Cuadro 1)

**CUADRO 1. Tratamientos hormonales para inducir el desarrollo de yemas axilares**

Hormona	Tratamientos (mg·L <sup>-1</sup> )							
	E	F	G	H	I	J	K	L
Cinetina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3
BAP	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.3	0.3
AIB	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3

A los 25 días, los brotes obtenidos, fueron subcultivados, y luego cada 27-30 días, para un total de seis veces, empleando los tratamientos H y L. Para el enraizamiento se usó el medio MS, con reducción de las sales al 75 %, sacarosa al 4 %, CA (1g·l<sup>-1</sup>) y 8 tratamientos variando las concentraciones hormonales de AIB y AIA en medio líquido, con pH 5,6. Ver Cuadro 2:

**CUADRO 2. Tratamientos hormonales para inducir el enraizamiento.**

Hormona	Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )							
	LL	M	N	Ñ	O	P	Q	R
AIB	0.0	0.0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.6	0.6
AIA	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2

## La fase de adaptación de las vitroplantas.

Las vitroplantas enraizadas se transfirieron a bolsas de polietileno negro con suelo de textura Loam arenoso de pH 5 y una cubierta de carbonilla, condiciones de alta

humedad relativa, reducción de la intensidad luminosa y riego por nebulización cada 15 minutos.

**Análisis biométrico:** Los experimentos siguieron un diseño completamente al azar con análisis de varianza y comparación de medias. Se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey, mediante el paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows, versión 8, 1998 (SSPS)

## RESULTADOS

A los 21 días de incubación en la oscuridad, se estableció el 38.3 % de los explantes, el resto se perdió a causa de la fenolización (7.2 %), contaminación (27.2 %) y dañados por la acción del desinfectante (27.3 %).

Los segmentos nodales establecidos y transferidos a los medios de cultivo de multiplicación, desarrollaron brotes cuyos resultados aparecen en el Cuadro 3. En este cuadro se puede observar que los mejores resultados, para las cuatro variables, fueron en los tratamientos: L, H, y J, que contienen una o ambas citocininas, más AIB, siendo estos tratamientos estadísticamente iguales.

**CUADRO 3. Porcentaje de explantes brotados y valores promedios de las variables**

Tratamientos	Brotación (%)	Brotos-Explante.
L	79.66 a	3.50 ab
H	77.33 a	3.53 a
J	74.16 ab	2.81 ab
K	69.83 b	2.60 ab
G	63.66 b	2.58 ab
I	62.16 b	2.45 c
E	35.83 c	1.83 c
F	25.50 c	1.88 c
Promedio	61.02	2.65

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes según Tukey ( $P < 0.05$ )

En los tres primeros subcultivos de los brotes, se obtuvieron los resultados que se muestran en el Cuadro 4.

**CUADRO 4. Multiplicación de brotes de *E. pellita* (Promedios de los tres primeros subcultivos)**

Tratamientos	Variables evaluadas	
	brotos-explante	yemas-brote
H	24.2	5.3
L	26.2	5.8
Promedio	25.4	5.7

Ambos tratamientos son estadísticamente iguales según la Prueba *t* ( $P < 0.05$ )

El Cuadro 5 resume los porcentajes de enraizamientos y valores promedios de las variables estudiadas.

**CUADRO 5. Porcentaje de enraizamiento y valores promedios de las variables estudiadas**

Hormonas (mg·L)	% de enraizamiento	Raíces/brote
<b>AIB + AIA</b>		
0.2 0.0	72.5 a	5.13 b
0.2 0.2	85.0 a	9.90 a
0.0 0.0	32.5 b	2.95 b
0.0 0.2	37.5 b	4.32 b
0.4 0.2	77.5 a	6.22 b
0.4 0.2	55.7 a	9.00 a
0.6 0.0	67.5 a	5.02 b
0.6 0.2	52.5 a	4.85 b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según Tukey ( $P < 0.05$ )

En cuanto al porcentaje de enraizamiento, existen diferencias significativas para el factor AIB, siendo diferentes los tratamientos que no contienen esta hormona. Con 0.2 mg·L<sup>-1</sup> de cada hormona, se obtuvo una buena conexión de los sistemas vasculares entre raíz y tallo, manifestándose en una abundante cabellera radical.

La sobrevivencia y características de las vitroplantas en la etapa de adaptación se resumen en el Cuadro 6.

**CUADRO 6. Características de vitroplantas de *E. pellita*, en condiciones de umbráculo.**

Características	Días de evaluación		
	20	40	60
Número de hojas	6	10	18
Diámetro del tallo (mm)	2,2	3.1	5.6
Altura (cm)	14	22	45
Sobrevivencia	80	74	72

## DISCUSIÓN

Major y Krause (1995), empleando similares procedimientos a los descritos en este trabajo, para el establecimiento de brotes epicórmicos de *E. grandis*, obtuvieron un 11 % de fenolización. Estos valores se consideran bajos, pues las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices. Este fenómeno es más agudo en las especies leñosas y

es reportado en una amplia gama de vegetales. El enjuague con solución de antioxidantes, posterior a la desinfección del explante, así como la adición de los mismos al medio de cultivo, como la L-cisteína, inhibidora de la polifenoloxidasas, y el carbón activado (absorbente de fenoles), son medidas que en este caso redujeron la fenolización, así como el empleo de medios de cultivo líquidos. Durand, *et al.*, (1991), plantearon que para reducir la fenolización en *Eucalyptus grandis*, es necesario incubar los tejidos en la oscuridad, lo que no favorece la síntesis de fenoles.

Con relación a la contaminación, se ha planteado que la superficie de los tejidos de las plantas constituye un hábitat para los microorganismos, los que se pueden alojar. estomas, lenticelas o cualquier abertura natural, dificultando su eliminación (Alvarado, 1998). En *Eucalyptus* y en general, en los árboles perennifolios latifoliados, se hace difícil la desinfección, pues los ápices meristemáticos no están cubiertos, o sea, presentan yemas desnudas, sin pérulas protectoras como las de los árboles deciduos latifoliados de regiones templadas y frías.

En el primer cultivo la relación brotes/explantes fue bajo, pues se trata del desarrollo de explantes primarios. Cuando se realiza la multiplicación de estos brotes, esta relación aumenta, ya que comienzan a desarrollarse yemas adventicias.

Los resultados que se muestran en el Cuadro 3 son similares a los obtenidos por Gupta y Mascarenhas (1983), los cuales lograron el desarrollo y proliferación de brotes a partir de nudos de ramas de árboles maduros de *Eucalyptus camaldulensis*, pero estos fueron inferiores a los reportados por Castro (1998), en *E. grandis* y *E. urograndis*, quien logró un coeficiente de multiplicación de 4.5 brotes/explante.

Al no ser diferentes los tratamientos que contienen BAP y/o cinetina en el medio de cultivo, se infiere que no es necesario adicionar la cinetina lo que se justifica además, por razones económicas. En ambos medios de cultivo, se desarrollaron macollos de brotes múltiples (25.4 como promedio). Estos valores son superiores a los obtenidos por Major y Krause (1995), en *Eucalyptus grandis*, quienes obtuvieron como promedio, por yema establecida, 10 tallos cada 20 días.

A partir del cuarto subcultivo, hubo una tendencia al incremento del número de brotes por explante, con una producción abundante de yemas adventicias, es decir, aumentó el coeficiente de multiplicación, con la formación de multiyemas, conjuntamente con las yemas de origen axilar.

Ikemori (1987), reporta en *Eucalyptus* dos tipos de yemas, unas que se encuentran en las axilas de las hojas conocidas como yemas desnudas, y otras que están en

dormancia y rodean al tejido peciolar, llamadas yemas escondidas u ocultas, que dan lugar a ramas secundarias. Los brotes múltiples producidos *in vitro*, pueden desarrollarse a partir de yemas preformadas ocultas o a partir de brotes “*de novo*” en el cultivo. Ambas formas de brotes se desarrollan y crecen, ampliando la ramificación, la que también se produce cuando se desarrollan las yemas axilares, resultando un denso macollo de brotes, como ocurrió en esta investigación.

Para la simplificación del proceso de micropropagación de *Eucalyptus*, muchos autores recomiendan efectuar la etapa de enraizamiento *ex vitro*, ya que esto es deseable desde el punto de vista económico y para mejorar la calidad del sistema radical formado en la planta (Aloisio, 1997).

Fuera del medio de cultivo, Las vitroplantas de *E. pellita* son altamente susceptibles al desecamiento de las hojas en pocos segundos, si no se mantienen condiciones de alta humedad. Es por eso que se deben transplantar utilizando un sistema de niebla intermitente o utilizar una técnica adicional de abrir parcialmente los recipientes de cultivo, cuando todavía se encuentran en la cámara de crecimiento por dos a tres días antes del trasplante, según recomendaciones de Agramont, *et al.* (1998).

La calidad de las plántulas fue el factor fundamental que afectó la sobrevivencia, pues diversas causas provocaron que el trasplante no se realizara en el momento oportuno, por la que algunas vitroplantas crecieron demasiado, desarrollando entrenudos largos, no siendo este un fenotipo óptimo.

## LITERATURA CITADA

- AGRAMONTE P.D.; JIMENEZ T.; DITA R., M. A. 1998. Acclimatización. In: Perez Ponce, J. N. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, pp. 193- 206
- ALVARADO C., V. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: Perez Ponce, J. N. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, pp. 180-102.
- ALOISIO, X. 1997. Enraizamiento *ax vitro* de gemas de *Eucalyptus* multiplicados e alongados *in vitro*. Scientia Forestalis N°. 51: 29-36 (en portugues).
- BAEZ, R.; DIAGO, I. 1998. El Patrimonio Forestal de Cuba, su importancia económica, ecológica y social. Cuba Forestal. Ministerio de la Agricultura. Cuba. Vol 1 No 011998, pp. 30-32.
- CASTRO R., D. 1998. Propagación *in vitro* de arbotes elites adultos de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urograndis*. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO'98. Resúmenes pp. 28-29. FAO. Cuba.
- DURAND C.; BOULAY, R.J.; FRANCKET, A. 1991. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Tissue Culture in Forestry. J. M. Bona, and D. J. Durzan (Eds): The Hague Nijhoff, Netherlands, pp. 150-181.

- GAMBORG, O. L.; SHYLUK P. H. 1981. Nutrition media and characteristics of plan cell and tissue culture, methods and applications in Agriculture. Thorpe Ed., pp. 21-45.
- GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. T. 1983. A tissue culture, method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. Plan Cell Resp. 2: 296-299.
- IKEMORI, V. K. 1987. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. Comm. For. Rev. 66: 351-355.
- MAJOR, G.; KRAUSE, M. 1995. Micropropagación de árboles adultos de *Eucalyptus grandis* Maiden (Hill). Revista Uruguay Forestal N° 8: 16-20.